

微量热泳技术在生物学研究中的应用

王书伟, 张学琴

(中国农业大学生物学院植物抗逆高效全国重点实验室, 北京 100193)

摘要: 微量热泳技术 (Microscale Thermolysis, MST) 是通过检测红外激光诱导的温度变化引起的荧光信号变化来定量两个分子之间相互作用的强度的一类生物物理技术。MST 技术对微弱温度差异下的分子热运动具有高度敏感性, 为生物分子体外相互作用的鉴定提供了一种灵活而快速的方法。本文依据 MST 的基本原理探索其在植物响应逆境胁迫过程中分子相互作用方面所发挥的重要作用和研究进展。

关键词: 微量热泳技术; 分子相互作用; 生命科学

Application of MicroScale Thermophoresis in Biological Research

Wang Shuwei, Zhang Xueqin

(State Key Laboratory of Plant Environmental Resilience, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: Microscale Thermolysis (MST) is a biophysical technique that quantifies molecular interactions by detecting changes in fluorescence signals induced by infrared laser-induced temperature changes. It provides a highly sensitive and flexible method for assessing molecular interactions under subtle thermal conditions. This article explores the significant role and research advances of MST in studying molecular interactions during plant responses to environmental stressors based on its fundamental principles.

Keywords: Microscale Thermolysis; Molecular interaction; Life science

1856 年, 生理学家 Carl Ludwig 和物理学家兼化学家 Charles Soret 首次观察到了热泳动现象 (Ludwig, 1856)。然而当时, 对于这一现象的机理未被充分理解和应用。直到 2008 年, 科学家们才在该现象的理论基础上创立了相关技术, 并成功设计出微量热泳动仪 (Wienken et al., 2010)。经过十多年的发展, MST 技术已被广泛应用于科研机构 and 制药企业, 成为研究分子间相互作用不可或缺的重要手段。

1 工作原理

为验证两个生物分子之间的相互作用，通常会选择将其中一个分子标记荧光染料或融合荧光蛋白作为目标分子 (Target)，然后与潜在的互作分子，即配体 (Ligand)，以一系列浓度比例混合后装入毛细管中。通过利用红外激光照射毛细管中央区域，产生一个中间高、两端低的温度梯度场，使得毛细管内的荧光分子在热泳动和 TRIC 效应 (Temperature-related intensity change, TRIC) 的作用下，在毛细管中央的荧光强度呈现梯度变化。通过荧光强度数据获得一系列 MST 曲线，并通过数据拟合得到 S 型曲线，进而计算解离常数 (K_d)。 K_d 值越小表示两个分子之间的亲和力越强，反之， K_d 值越大则表示亲和力越弱 (图 1)。

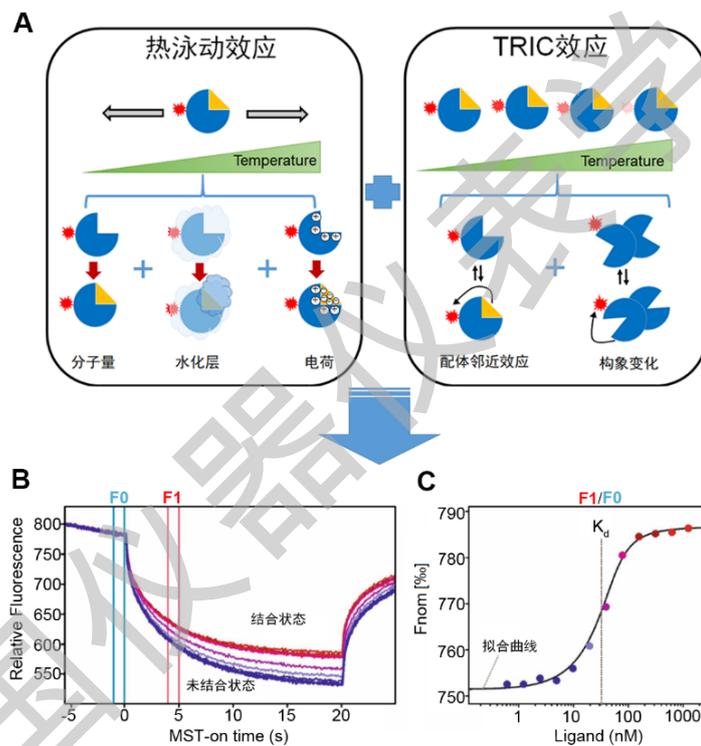


图 1 MST 技术的工作原理

2 在生命科学领域中的应用

近年来，MST 技术已成为研究蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸 (DNA/RNA)、蛋白质与离子、蛋白质与小分子化合物相互作用的关键技术。中国农业大学植物抗逆高效全国重点实验室于 2015 年引入微量热泳动仪，迄今在揭示植物响应逆境胁迫的分子机制方面获得了非常置信的结果。现将该实验室利用 MST 技术揭示了生物体内重要分子间相互作用的典型案例做简要介绍，为深入理解这些相互作用提供了重要参考。

2.1 蛋白与蛋白的互作

蛋白质之间的相互作用是细胞内信号传导、代谢调控和功能实现的重要基础。在科研实验中，酵母双杂交、体外 pull down 和免疫共沉淀等方法常用于蛋白互作的初步验证，然而这些方法通常仅能提供定性信息。相比之下，MST 技术不仅能够定性鉴定蛋白质相互作用，还具备定量分析的能力。因此，MST 技术在研究蛋白质相互作用领域备受青睐。

中国农业大学植物抗逆高效全国重点实验室毛同林教授课题组发现了微管结合蛋白 SPIRAL1 (SPR1) 可以被 ABA 信号通路中的核心组分蛋白激酶 OPEN STOMATA 1 (OST1) 磷酸化，直接参与 ABA 诱导的微管解聚以及气孔关闭过程。在该研究中，作者利用 MST 技术研究了不同磷酸化形式的 SPR1 蛋白与游离态微管二聚体的结合能力。发现持续磷酸化形式的 SPR1^{S6D} 与游离态微管二聚体的解离常数 (Kd) 为 $0.82 \pm 0.21 \mu\text{M}$ ，明显高于野生型 ($Kd = 5.94 \pm 1.63 \mu\text{M}$) 和持续去磷酸形式的 SPR1^{S6A} ($Kd = 3.18 \pm 1.08 \mu\text{M}$)。表明持续磷酸化形式的 SPR1^{S6D} 与游离态微管二聚体具有较强的结合能力 (Wang et al., 2023)。

2.2 蛋白质与核酸 (DNA) 互作

蛋白质与 DNA 之间的相互作用在基因表达调控、基因组稳定性维持和细胞周期调控等重要生物学过程中发挥重要作用。实验室通常采用电泳迁移率变动分析 (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) 方法来研究这种相互作用，然而该方法存在一些明显的缺陷，如需要较大样品用量、难以定量评估蛋白质与 DNA 结合能力以及可能出现漏检等问题。相比之下，MST 技术能够有效地克服这些问题，提供确定的蛋白质与 DNA 结合特性的信息。

中国农业大学生物学院陈忠周教授课题组开发了一套基于 MST 技术有效获得目标蛋白与 DNA 结合的实验体系 (图 2)。该课题组在数据库中筛选出与目标蛋白可能结合的天然 DNA 序列。按照实验需求对这些天然序列进行单碱基突变并合成相应的 DNA 序列。再利用 MST 技术测定不同 DNA 序列与目标蛋白的解离常数 (Kd 值)。最后，对筛选得到的目标蛋白-DNA 复合物进行结晶培养并利用 X 射线散射技术解析其晶体结构，揭示 DNA 和目标蛋白相互作用的分子机制 (Liu et al., 2023)。该课题组利用上述方法成功地获得了拟南芥组蛋白去甲基化酶 REF6 的锌指结构域与靶基因相互作用的机制。通过对 REF6 与其 DNA 复合物的晶体结构进行解析，揭示了 REF6 在识别靶 DNA 序列时采用的多种识别机制 (Tian et al., 2020)。

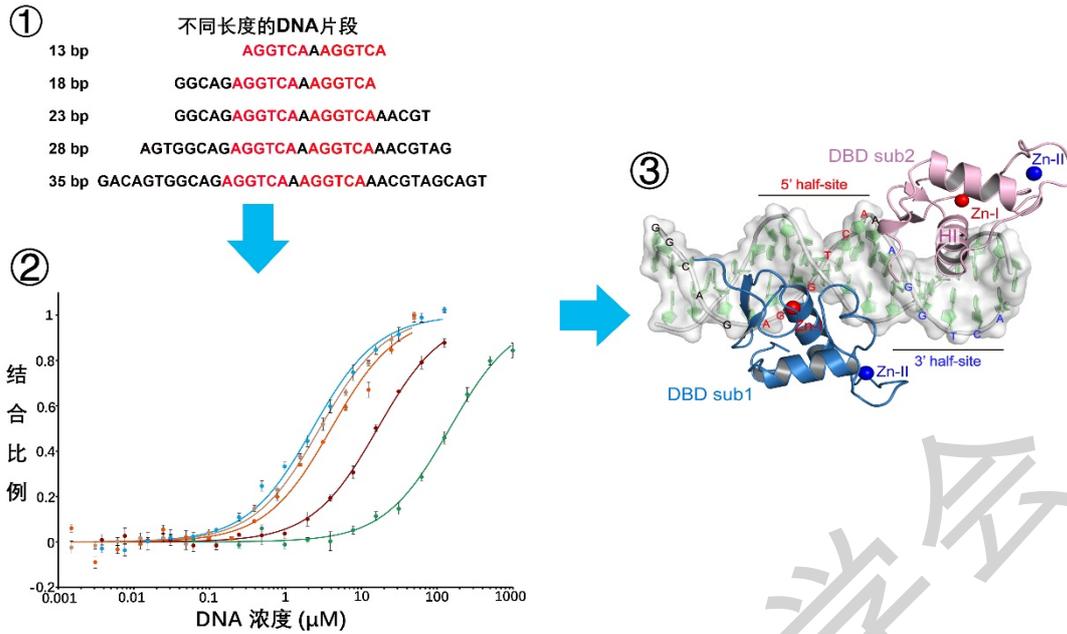


图2 MST 技术辅助解析蛋白质-DNA 复合物晶体的工作流程 (Liu et al., 2023)

2.3 蛋白质与离子互作

蛋白质与离子之间的相互作用是 MST 技术的优势之一。以蛋白质与 Ca^{2+} 的相互作用为例, Ca^{2+} 的分子量仅为 40 Da, 与蛋白相比, 属于质量非常小的离子。传统实验方法往往难以检测到蛋白质与 Ca^{2+} 之间的相互作用。然而 MST 技术的检测原理并不依赖于分子的大小, 而是基于分子的电荷、水化层以及荧光基团周围微环境的变化, 因此, 可以克服常规方法达到蛋白与离子结合的鉴定目的。

环境胁迫诱导植物细胞胞质内 Ca^{2+} 浓度的迅速升高。钙信号途径激活的下游通路如何调节蛋白功能一直是当前研究的焦点。在植物抗逆性研究领域, 杨淑华教授、郭岩教授和巩志忠教授等研究团队进行了相关研究, 确认在不同环境胁迫诱导的信号传导途径中存在一类钙离子结合蛋白, 在植物细胞内扮演感知、识别和解读 Ca^{2+} 信号的重要角色, 能够维持细胞在特定环境胁迫下的正常生理活动。如盐胁迫下 14-3-3 蛋白和 AtANN4 蛋白 (Yang et al., 2019; Ma et al. 2019)、冷胁迫下的 ANNEXIN1 和 CPK28 蛋白 (Liu et al., 2021; Ding et al., 2022)、干旱胁迫下的 ZmCPK17 蛋白 (Hu et al., 2024)。以上这些工作都利用 MST 技术获得了蛋白质与 Ca^{2+} 之间存在直接结合的关键数据, 为我们深入理解蛋白质与 Ca^{2+} 之间的相互作用提供了重要的实验依据。由此可见, 对于分子量较小或两者之间存在较大分子量差异的情况, MST 技术展现出明显的优势。

2.4 蛋白与小分子物质互作

蛋白质与小分子化合物之间的相互作用是研究细胞信号转导或代谢调节等生物学过程中的关键节点，如与蛋白酶的结合可以激活或抑制其功能。传统的检测方法，如 ELISA，由于其抗体容易产生交叉反应等问题，准确率不高，因此需要新的技术手段来解决这些问题，MST 技术的出现为蛋白质与小分子化合物相互作用的研究提供了一种新的方法，弥补了传统技术的不足。

ENB1 是编码一类玉米纤维素合成酶，在探究其功能时，植物抗逆高效全国重点实验室宋任涛教授团队利用 MST 技术对其与通用底物尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-Glucose, UDP-Glc) 的结合进行了研究 (图 3)。研究发现 ENB1 能够结合 UDP-Glc，并通过调控籽粒基底胚乳传递层细胞的细胞壁向内生长进而增强光合同化物蔗糖从母本植株到胚乳中的转运，最终维持永久型胚乳的发育 (Wang et al., 2022)。因此 MST 技术为深入了解植物细胞壁合成和代谢调节提供了新思路和新方法。

磷脂酸 (PA) 作为膜磷脂之一，作为第二信使参与多种生物学过程。传统的脂质斑点印记法虽然能定性检测 PA 与蛋白间的相互作用，但无法提供结合强度的定量参数。近期，植物抗逆高效全国重点实验室郭岩教授团队认为盐胁迫条件下 PA 通过 SOS 途径的 SOS2-SOS1 模块促进 Na^+ 的外流，另一方面也通过 SOS 途径的 SOS2-SCaBP8-AKT1 模块促进 K^+ 的内流，共同调节植物的 Na^+/K^+ 稳态并维持植物在盐胁迫环境中的生存。在该项研究中，作者用 MST 技术确定了 SOS2 中与 PA 相互作用的关键氨基酸位点，并验证了当该位点发生突变时，SOS2 与 PA 的结合能力显著降低 (Li et al., EMBO J, 2023)。这两个案例充分说明 MST 技术在蛋白质与小分子化合物相互作用研究中突破了传统实验技术的限制，实现了“由质到量”的重大转变。

2.5 三元互作体系

三元相互作用也是 MST 技术应用的重要研究领域。传统的 pull down 实验在进行三元互作时存在操作复杂、无法精准定量等问题。相比之下，MST 技术能有效克服上述困难，如竞争性实验中，可以精确测定解离常数和抑制系数。目前，MST 技术在研究三元互作体系中得到了广泛应用。同样还是郭岩教授团队的工作，发现了盐胁迫下，钙信号感受器 SCaBP8 结合 Ca^{2+} 后抑制了蛋白磷酸酶 PP2C D6 和 D7 的活性，导致 PP2C 与质膜定位的 SOS1 二者解离，解除对 SOS1 的抑制作用，激活 SOS1 所介导的信号转导途径，帮助植物抗盐。本研究用 MST 技术证实了 PP2C D6 与 SCaBP8 只有当 Ca^{2+} 存在时二者才能相互作用 (图 3) (Fu et al., 2023)。因此，MST 技术可用于验证实验中多个生物分子之间的相互作用，

并有助于在分子水平上深入探究特定生物过程的作用机制。

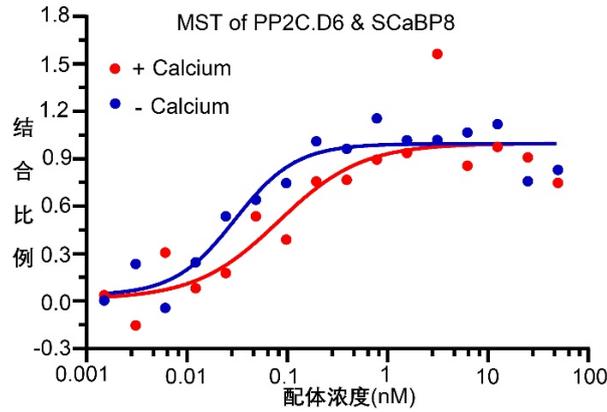


图3 MST 技术验证 Ca^{2+} 对 SCaBP8 与 PP2C.D6 相互作用的影响 (Fu et al., 2023)

3 结论

MST 技术利用监测荧光标记物质在溶液中荧光强度变化来揭示分子间相互作用，从而有助于深入了解生物学过程。相对于表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 和等温滴定量热法 (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) 等技术，MST 技术具备上样量低、灵敏度高 (pM 级别)、无需考虑分子量大小限制等优势。当前，该技术已广泛应用于多领域科研，为亲和力测定、作用机理研究、药物筛选等提供了技术支持。本文初步探讨了中国农业大学植物抗逆高效全国重点实验室引入的微量热泳动仪后在植物响应环境胁迫等生物学过程中的应用与进展。

参考文献:

- Ding YL, Yang HL, Wu SF, et al. CPK28-NLP7 module integrates cold-induced Ca^{2+} signal and transcriptional reprogramming in *Arabidopsis* [J]. *Science Advances*. 2022, 8(26):eabn7901.
- Fu HQ, Yu X, Jiang YY et al. SALT OVERLY SENSITIVE 1 is inhibited by clade D Protein phosphatase 2C D6 and D7 in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Cell*. 2023, 35(1):279-297.
- Hu XY, Cheng JK, Lu MM, et al. Ca^{2+} -independent ZmCPK2 is inhibited by Ca^{2+} -dependent ZmCPK17 during drought response in maize [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2024, doi: 10.1111/jipb.13675.
- Li JF, Shen LK, Han XL, et al. Phosphatidic acid-regulated SOS2 controls sodium and potassium homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress [J]. *The EMBO Journal*, 2023, 42(8):e112401.
- Liu, QB, Ding, YL, Shi, YT, et al. The calcium transporter ANNEXIN1 mediates cold-induced calcium signaling and freezing tolerance in plants [J]. *The EMBO Journal*, 2021, 40 (2): e104559.
- Liu YL, Ma LL, Li M et al. Structures of human TR4LBD-JAZF1 and TR4DBD-DNA complexes reveal the

- molecular basis of transcriptional regulation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51 (3):1443-1457.
- Ludwig, C. Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen [J]. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math.-Naturwiss.* 1856, 20,539.
- Ma, L, Ye, JM, Yang, YQ, *et al.* The SOS2-SCaBP8 complex generates and fine-tunes an AtANN4-dependent calcium signature under salt stress [J]. *Development Cell.* . 2019, 48(5), 697-709.
- Tian ZZ, Li X., Li M., *et al.* Crystal structures of REF6 and its complex with DNA reveal diverse recognition mechanisms [J]. *Cell Discovery* 2020, 6:17.
- Wang P, Qi SJ, Wang XH, *et al.* The OPEN STOMATA1–SPIRAL1 module regulates microtubule stability during abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell.* 2023, 35(1):260-278.
- Wang Q, Wang MM, Chen J, *et al.* ENB1 encodes a cellulose synthase 5 that directs synthesis of cell wall ingrowths in maize basal endosperm transfer cells [J]. *The Plant Cell*, 2022, 34(3):1054-1074.
- Wei C, Wang SZ, Liu PW, *et al.* The PdeK-PdeR two-component system promotes unipolar localization of FimX and pilus extension in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* [J]. *Science Signaling*, 2021, 14(700):eabi9589.
- Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U *et al.* Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis [J]. *Nature Communication*, 2010, 1:100.
- Yang, ZJ, Wang, CW, Xue, Y, *et al.* Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance [J]. *Nature Communication*, 2019, 10(1): 1199.